

B6

# Inhibiting expression of target gene, useful e.g. for inhibiting oncogenes, by administering double-stranded RNA complementary to the target and having an overhang

**Publication number:** DE10160151 (A1)

**Publication date:** 2003-06-26

**Inventor(s):** LIMMER SYLVIA [DE]; KREUTZER ROLAND [DE]; LIMMER STEFAN [DE]

**Applicant(s):** RIBOPHARMA AG [DE]

**Classification:**

- international: C12N15/09; A61K9/127; A61K31/7105; A61K31/7115; A61K31/7125; A61K47/34; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P25/28; A61P31/12; A61P33/06; A61P35/00; A61P35/04; A61P37/02; A61P43/00; C07H21/02; C12N15/11; A61K38/00; C12N15/09; A61K9/127; A61K31/7105; A61K31/7115; A61K31/7125; A61K47/34; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P33/00; A61P35/00; A61P37/00; A61P43/00; C07H21/00; C12N15/11; A61K38/00; (IPC1-7): C12N15/63; C12N15/11

- European: C12N15/11B7

**Application number:** DE20011060151 20011207

**Priority number(s):** DE20011060151 20011207; DE20011000586 20010109; DE20011055280 20011026; DE20011058411 20011129

**Also published as:**

WO02055693 (A2)  
WO02055693 (A3)  
US2004175703 (A1)  
JP2004519458 (T)  
EP1352061 (A2)

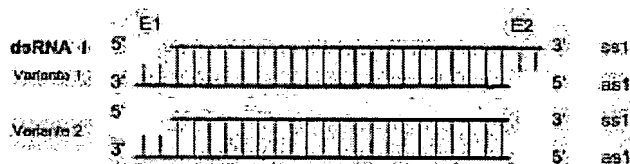
more >>

**Cited documents:**

DE10100587 (C1)  
DE10100588 (A1)

## Abstract of DE 10160151 (A1)

Inhibiting expression of a target gene (I) in a cell by introducing an inhibitory RNA (dsRNA1) having a double-stranded structure of at most 49 consecutive bases, is new. At least part of one strand (as1) of dsRNA1 is complementary to (I) and at least one end of dsRNA1 has an overhang of 1-4 nucleotides (nt).



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 60 151 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 15/63**  
C 12 N 15/11

⑳ Aktenzeichen: 101 60 151.4  
㉔ Anmeldetag: 7. 12. 2001  
㉕ Offenlegungstag: 26. 6. 2003

**DE 101 60 151 A 1**

⑦① Anmelder:  
Ribopharma AG, 95447 Bayreuth, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Gassner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

⑦② Erfinder:  
Limmer, Sylvia, Dr., 95512 Neudrossenfeld, DE;  
Kreutzer, Roland, Dr., 95466 Weidenberg, DE;  
Limmer, Stefan, Dr., 95512 Neudrossenfeld, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 101 00 587 C1  
DE 101 00 588 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang (S1) der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist. Zur Verbesserten Wirksamkeit wird vorgeschlagen, dass die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist.

**DE 101 60 151 A 1**

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren, wie es z. B. aus der WO 00/44895 bekannt ist.

[0002] Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren, Medikament, eine Verwendung verbesserter Wirksamkeit zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle anzugeben. Insbesondere sollen das Verfahren, Medikament und die Verwendung in vivo anwendbar sein.

[0003] Diese Aufgabe wird durch die im Anspruchskomplex wiedergebenden Merkmale gelöst.

[0004] Das Verfahren ermöglicht vorteilhafterweise eine besonders effektive Hemmung der Expression eines Zielgens in vivo. Die erfindungsgemäß beanspruchte dsRNA zeichnet sich durch eine gute Wirksamkeit bei gleichzeitig hoher Serumstabilität aus. Die dsRNA kann überraschenderweise aufgenommen in einer geeigneten Lösung, z. B. intravenös, appliziert werden. Es ist nicht erforderlich besondere Maßnahmen zu treffen, um die dsRNA in die Zelle einzuschleusen.

## Ausführungsbeispiele

## In vivo-Studie-Ausführungsbeispiel

[0005] Es wurde "GFP-Labormäuse", welche das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-Sequenz abgeleitet wurde, i. v. injiziert. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet und die GFP-Expression in Nierenschnitten und im Serum gegenüber Tieren, die dsRNAs erhielten, die nicht aus der GFP-Sequenz abgeleitet war, untersucht.

## Versuchsprotokoll

## Synthese der dsRNA

25

## Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung

[0006] Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFP)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev 76: 79-90). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

[0007] Die Untersuchung erfolgte gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makrolon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten Temperatur von 20°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15 der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Altromin) ad libitum.

[0008] Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen gehalten. Die Injektionen erfolgten i. v. in die Schwanzvene im 12 h-Turnus über 5 Tage hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Tier und die Dosis betrug 2.5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg Tier. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt: Gruppe A bestand aus 6 Tieren und erhielt PBS (phosphate buffered saline), Gruppe B, 2 Tiere, erhielt 2.5 mg einer Kontroll-dsRNA (S1-Kontrolle) pro kg, Gruppe C, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg einer weiteren Kontroll-dsRNA (S7-Kontrolle) pro kg, Gruppe D, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S1 bezeichnet) pro kg, Gruppe E, 6 Tiere, erhielt 2.5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S7 bezeichnet) pro kg und Gruppe F, 6 Tiere, erhielt 50 µg S1-dsRNA pro kg. Nach der letzten Injektion wurden die Tiere im zeitlichen Abstand von 14-20 h getötet, Organe und Blut entnommen.

## Organentnahme

[0009] Sofort nach dem Töten der Tiere wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilem Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in Methyl Carnoy's (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24 h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme auf Eis gehalten, 5 min. bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, Serum abgenommen und bei -80°C gelagert.

## Prozessieren der Biopsien

[0010] Nach 24 h Fixierung in MC wurden die Biopsien in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT dehydriert: je 490 min. 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1 h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2 h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica) Gewebeschnitte von 3 µm Schnittdicke angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min. bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

## Immunperoxidase-Färbung gegen GFP

[0011] Die Schnitte wurden 3 × 5 min. in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 × 3 min. 100% Ethanol, 2 × 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min. in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Nach 3 × 3 min. Waschen mit PBS wurde mit dem 1. Antikörper (goat-polyklonaler anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) 1 : 500 mit 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (1 : 2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min. bei RT, danach wurde für 30 min. mit Avidin D Peroxidase (1 : 2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 × 3 min. in PBS gewaschen. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA) verdünnt. Die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 × 5 min. Xylol wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

## SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Serumproteine

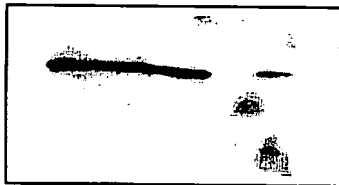
[0012] Die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyakrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1.5 mm Dicke gegossen: 7.5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0.9%), 3.8 ml 1.0 M Tris/HCl, pH 8.4, 150 µl 10% SDS, 3.3 ml Aqua bidest., 250 ml Ammoniumpersulfat (10%), 9 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0.1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0.83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.9%), 630 ml 1.0 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 ml Aqua bidest., 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED.

[0013] Vor dem Auftrag auf das Gel wurden je 3 µl Serum mit 6 µl Aqua bidest. und 3 µl 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithioereithol), 0.02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min. im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker verwendet.

## Western Blot und Immundetektion

[0014] Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm<sup>2</sup> für 1.5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0.1% SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0.1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal je 3 min. mit 0.1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschrte erfolgten in 0.1% Tween-20/PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat-polyklonaler anti-GFP) erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurde 3 × 5 min. gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Hoseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.

A B C D E F



## Inhibition der GFP-Expression im Serum

[0015] Je 3 µl Serum wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot quantifiziert: A) PBS-Kontrolle; B) K1-Kontrolle (0-22-0); C) K3-Kontrolle (2-19-2); D) S1 (0-22-2); S) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 der D-Konzentration).

## Hemmung der Genexpression eines Zielgens in kultivierten HELA-S3-Zellen und Mausfibroblasten durch dsRNA

[0016] Die Effektivität der Inhibition der YFP-Expression nach transienrer Transfektion eines YFP-codierenden Plasmids auf der Basis der RNA-Interferenz mit dsRNAs läßt sich durch Gestaltung der 3'-Enden und der Länge des basen-gepaarten Bereichs modulieren.

## Ausführungsbeispiel

[0017] Zum Wirksamkeitsnachweis der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der Genexpression wurden transient transfizierte NIH/3T3-Zellen (Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo, ECCAC (European collection of animal cell

- culture) Nr. 93061524) und HELA-53 (humane cervikale Karzinomzellen, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Nr. ACC 161) verwendet. Für die Transfektion wurde das Plasmid pcDNA-YFP verwendet, das ein 800 bp großes Bam HI/Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pcDNA3 enthält. Aus der Sequenz des Yellow-fluoreszierenden Proteins (YFP) wurden daraus abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) hergestellt und zusammen mit dem pcDNA-YFP transient in die Fibroblasten transfiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme gegenüber Zellen ohne dsRNA und gegenüber Zellen, die mit pcDNA-YFP und einer Kontroll-dsRNA (nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet) transfiziert wurden, ausgewertet.

#### Versuchsprotokoll

10

#### dsRNA-Synthese

- [0018] Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9 x 250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Aufheizen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80–90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

#### Aussaat der Zellen

- [0019] Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der NIH/3T3-Zellen und der HELA-S3 erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom), für die Mausfibroblasten, und Ham's F12 für die HELA-Zellen mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10 x Trypsin/EDTA, Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von  $1.0 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Platte (Multiwell Schalen 96-Well Flachboden, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µl Wachstumsmedium ausgesät.

#### Durchführung der transienten Transfektion

35

- [0020] Die Transfektion wurde mit Lipofectamine Plus™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden 0.15 µg pcDNA-YFP-Plasmid eingesetzt. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug 60 µl. Es wurden jeweils 3fach-Proben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zuerst zusammen mit der dsRNA komplexiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA und die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt und pro 0.1 µg Plasmid-DNA 1 µl PLUS Reagent eingesetzt (in einem Volumen von 10 µl) und nach dem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde pro 0.1 µg Plasmid-DNA 0.5 µl Lipofectamine in insgesamt 10 µl serumfreiem Medium verdünnt, gut gemischt, zu dem Plasmid/dsRNA/PLUS-Gemisch zugegeben und nochmals 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 200 µl serumfreiem Medium gewaschen und danach mit 40 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine pro Well wurden die Zellen für 2.5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Inkubation 1 x mit 200 µl Wachstumsmedium gewaschen und für 24 Stunden bis zur Detektion der Fluoreszenz in 200 µl Wachstumsmedium im Brutschrank inkubiert.

50

#### Detektion der Fluoreszenz

- [0021] 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (IX50-S8F2, Fluoreszenz-Einheit U-ULS100Hg, Brenner U-RFL-T200, Olympus) mit einer USH-I02D-Quecksilber-Lampe (USHIO Inc., Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem WIB-Fluoreszenz-Würfel und einer digitalen CCD-Kamera (Orca IIm, Hamamatsu) und C4742-95 Kamera-Controller) fotografiert. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der analysis-Software 3.1 (Soft Imaging System GmbH, Deutschland). Um die YFP-Fluoreszenz in Relation zur Zelldichte zu setzen, wurde eine Zellkernfärbung (Hoechst-Staining) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Methylcarnoy (75% Methanol, 25% Eisessig) zuerst für 5 und danach nochmals für 10 Minuten in Methylcarnoy fixiert. Nach dem Lufttrocknen wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit 100 µl pro Well Hoechst-Farbstoff (75 ng/ml) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS (PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrom) wurden die Hoechst-gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, WU-Fluoreszenz-Würfel für Hoechst) photographiert.

- [0022] In den Abb. 1 bis 5 ist die Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA in kultivierten Maus-Fibroblasten dargestellt:

- Die Abb. 1, 2 und 3 sind Graphiken, die den Effekt von dsRNAs, die aus der Sequenz von YFP abgeleitet sind, und von Kontroll-dsRNAs auf die YFP-Expression in NIH/3T3-Mausfibroblasten nach transienter Transfektion zeigen, wie im Versuchsprotokoll beschrieben. Die Konzentration der dsRNA bezieht sich auf die Konzentration im Medium und ist auf der x-Achse angegeben. Die Bezeichnung für die dsRNAs sind der Tabelle "Sequenzen" zu entnehmen. Dargestellt ist

die relative Fluoreszenz pro Bildausschnitt in % Fläche. Pro Well wurden 3 verschiedene Bildausschnitte ausgewertet. Die Mittelwerte ergeben sich aus den 3fach-Ansätzen. In den **Abb. 4** und **6** ist die spezifische Inhibition der YFP-Genexpression durch dsRNAs in HELA-S3-Zellen dargestellt.

**[0023]** Die **Abb. 5** zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten NIH/3T3-Mausfibroblasten ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs ( $\times 100$  Vergrößerung).

5A: YFP-Kontrolle

5B: S1, 10 nM

5C: S4, 10 nM

5D: S7, 10 nM

5E: S7/S12, 1 nM

5F: S7/S12, 1 nM

**[0024]** Die **Abb. 6** zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten HELA-S3-Zellen ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs ( $\times 100$  Vergrößerung).

6A: K2-Kontrolle, 10 nM

6B: S1, 10 nM

6C: S4, 10 nM

6D: S7, 10 nM

6E: S7/11, 1 nM

6F: S7/12, 1 nM

6G: S1A/S4B, 10 nM

6H: YFP-Kontrolle

### Schlußfolgerungen

**[0025]** In **Abb. 1** ist zu sehen, daß die Inhibition der YFP-Expression nach transienter Transfektion von Mausfibroblasten mit dem YFP-Plasmid zusammen mit spezifisch gegen die YFP-Sequenz gerichteten dsRNAs dann besonders wirkungsvoll gehemmt wird, wenn die 3'-Enden der 22 und 19 Basengepaare enthaltenden Bereiche der dsRNAs einzelsträngige Abschnitte von 2 Nukleotiden aufweisen. Während die dsRNA S1 mit glatten 3'-Enden bei einer Konzentration von 1 nM (bezogen auf die Konzentration im Zellkultur-Medium während der Durchführung der Transfektion) keine inhibitorischen Effekte auf die YFP-Expression zeigt, inhibieren die dsRNAs S7 (19 basengepaarte Nukleotide) und S4 (22 basengepaarte Nukleotide) mit jeweils 2nt Überhängen auf beiden 3'-Enden die YFP-Expression um 50 bzw. um 70% im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-dsRNAs K3 und K2, deren Sequenzen nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet sind. Bei einer Konzentration von 10 nM inhibiert die als S1 bezeichnete dsRNA mit glatten Enden die YFP-Expression um ~65%, während die Inhibition der YFP-Expression durch die S4 dsRNA ~93% beträgt. Der inhibitorische Effekt der mit S4 und S7 bezeichneten dsRNAs ist konzentrationsabhängig (**Abb. 1** und **2**, siehe auch **Abb. 4**). Weiterhin ist aus der **Abb. 2** zu entnehmen, daß für die effiziente Unterdrückung der YFP-Genexpression die einzelsträngige Ausbildung nicht an beiden 3'-Enden (auf sense und antisense-Strang) notwendig ist. Um eine möglichst effektive Inhibition der YFP-Expression zu erreichen, ist lediglich der 2nt-Überhang am 3'-Ende auf dem antisense-Strang (dem zur YFP-mRNA komplementären Bereich) notwendig. So liegt die Inhibition der YFP-Expression bei einer Konzentration von 1 nM bei beiden dsRNAs S4 (mit 2nt-Überhängen auf beiden 3'-Enden) und S1A/S4B (mit einem 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des antisense-Stranges) bei ~70%. Befindet sich dagegen der 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des sense-Stranges (und das 3'-Ende des antisense-Stranges trägt keinen einzelsträngigen Bereich) so liegt die Inhibition der YFP-Genexpression lediglich bei 50%. Analog ist die Inhibition bei höheren Konzentrationen deutlich besser, wenn mindestens das 3'-Ende des antisense-Stranges einen 2nt-Überhang trägt.

**[0026]** Eine weitere Erhöhung der Hemmung der YFP-Expression wird erreicht, wenn der basengepaarte Bereich 21 Nukleotid-Paare statt 22 (S1 und S4) oder 19 (S7) umfasst. So beträgt die Inhibition der YFP-Expression durch S1 (22 Basenpaarungen mit glatten Enden) ~40%, während die Inhibition durch S7/S12 (21 Basenpaarungen mit glatten Enden) bei ~92% liegt. Enthält die dsRNA mit 21 Basenpaarungen noch einen 2nt-Überhang am antisense-Y-Ende (S7/S11), so liegt die Inhibition bei ~97% (verglichen mit ~73% Inhibition durch S4 und ~70% Inhibition durch S7).

### Untersuchung der Serumstabilität der doppelsträngigen RNA (dsRNA)

**[0027]** Ziel ist es, die in den Zellkulturen gefundene Effektivität der durch dsRNAs vermittelten Hemmung der Genexpression von Zielgenen für den Einsatz in vivo noch weiter zu steigern, indem durch die Erhöhung der Stabilität der dsRNAs im Serum und damit deren Verweilzeit unter in vivo-Bedingungen die wirksame Konzentration des funktionellen Moleküls erhöht wird.

### Ausführungsbeispiel

**[0028]** Die Serumstabilität der die GFP-Expression hemmenden doppelsträngigen Oligoribonukleotide (dsRNA) wurde ex vivo in murinem und humanem Serum getestet.

### Versuchsprotokoll

**[0029]** Die Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum mit der entsprechenden dsRNA erfolgte bei 37°C in Heizblock. Es wurden je 85 µl Serum mit 15 µl 100 µM dsRNA inkubiert. Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h) wurden die Proben sofort bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurde dsRNA ohne Serum (+85 µl ddH<sub>2</sub>O) und dsRNA mit Serum zum Zeitpunkt 0 verwendet.

- [0030] Für die Isolierung der dsRNA aus dem Inkubationsansatz, die auf Eis erfolgte, wurden jeweils 400 µl 0.1% SDS zu den Ansätzen gegeben und einer Phenolextraktion unterzogen: Pro Ansatz wurden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (IAA, 25 : 24 : 1, Roti®-Phenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 30 sec auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie-2; Scientific Industries). Nach 10minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12 000 xg, 4°C, für 10 min. (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). Die obere wässrige Phase (ca. 200 µl) wurde abgenommen und zuerst einem DNase I- und danach einem Proteinase K-Verdau unterzogen: Zugabe von 20 µl 10 x fach DNaseI-Puffer (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) und 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min. Inkubation bei 37°C, erneute Zugabe von 6 U DNase I und Inkubation für weitere 20 min. bei 37°C, Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peqlab, Deutschland) und 30 min. Inkubation bei 37°C. Danach wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde 500 µl Phenol : Chloroform : IAA (25 : 24 : 1) zugegeben, 30 sec auf höchster Stufe gevortext, 10 min. bei 12 000 xg, 4°C, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nacheinander mit 40 µl 3 M Na-Ac (Natriumacetat), pH 5.2, und 1 ml 100% EtOH versetzt, dazwischen gut gemischt und für mindestens 1 h bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 12 000 xg für 30 min. und 4°C pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min. 12 000 xg, 4°C). Das luftgetrocknete Pellet wurde in 30 µl RNA-Gelaufragspuffer (7 M Harnstoff, 1 x TBE (0.09 M Tris-Borat, 0.002 EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 0.02% (w/v) Bromphenolblau, 0.02% (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.

- [0031] Zur Charakterisierung der dsRNA wurde eine analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (analytische PAGE) durchgeführt. Die Harnstoffgele wurden kurz vor dem Lauf hergestellt: 7 M Harnstoff (21 g) wurde in 25 ml 40% wässrige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese-Gel, A515.1, Roth) und 5 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 9.3 g EDTA pro L Aqua dest.) unter Rühren gelöst und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Kurz vor dem Gießen wurden 50 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 500 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat) zugesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur (Merck, Darmstadt) eingesetzt und ein Vorlauf für 30 min. bei konstant 40 mA Stromstärke durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die RNA-Proben für 5 min. bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und für 20 sec in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, minispin) abzentrifugiert. Es wurden je 15 µl auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für ca. 2 h bei einem konstanten Stromfluß von 40 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min. bei RT (Raumtemperatur) mit Stains all-Färbelösung (20 ml Stains all Stammlösung (200 mg Stains all in 200 ml Formamid gelöst) mit 200 ml Aqua dest. und 180 ml Formamid versetzt) gefärbt und die Hintergrundfärbung danach durch Spülen in Aqua dest. für 45 min. entfernt. Die Gele wurden mit dem Photodokumentationssystem Image Master VDS von Pharmacia photographiert.

- [0032] Die Abb. 7 bis 14 zeigen die Serumstabilität der dsRNA nach Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum und nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung im 20%igem 7 M Harnstoffgel.

[0033] Abb. 7: Inkubation von S1 (0-22-0) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. zum Zeitpunkt 0
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 12 Stunden
8. 2 µl 100 µM S1 ohne Inkubation
- S1A) sense S1 (10 µl 20 µM S1A)
- S1B) antisense S1 (10 µl 20 µM S1B)

[0034] Abb. 8: Inkubation von S1 (0-22-0) in humanem Serum

1. 2 µl 100 µM S1 unbehandelt (ohne Inkubation)
2. für 30 Minuten
3. für 2 Stunden
4. für 4 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 8 Stunden
7. für 12 Stunden
8. für 24 Stunden
- S1A) sense S1 (10 µl 20 µM S1A)
- S1B) antisense S1 (10 µl 20 µM S1B)

[0035] Abb. 9: Inkubation von S7 (2-19-2) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 30 Minuten
3. für 4 Stunden
4. für 12 Stunden

[0036] Abb. 10: Inkubation von S7 (2-19-2) in humanem Serum

1. sense S7 (10 µl 20 µM S7A)

2. antisense S7 (10 µl 20 µM S7B)	
3. für 30 Minuten	
4. für 1 Stunde	
5. für 2 Stunden	
6. für 4 Stunden	5
7. für 6 Stunden	
8. für 12 Stunden	
9. für 24 Stunden	
10. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)	10
<b>[0037] Abb. 11: Inkubation von K3 (2-19-2) in Maus-Serum</b>	
1. sense K3 (10 µl 20 µM K3A)	
2. antisense K3 (10 µl 20 µM K3B)	
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)	15
4. zum Zeitpunkt 0 (mit Serum)	
5. für 30 Minuten	
6. für 1 Stunde	
7. für 2 Stunden	
8. für 4 Stunden	20
9. für 12 Stunden	
<b>[0038] Abb. 12: Inkubation von PKC1/2 (0-22-2) in Maus-Serum</b>	
1. für 30 Minuten	25
2. für 1 Stunde	
3. für 2 Stunden	
4. für 4 Stunden	
5. für 12 Stunden	
6. 2 µl 100 µM PKC1/2 (unbehandelt)	30
<b>[0039] Abb. 13: Inkubation von S1A/S4B (0-22-2) in humanem Serum</b>	
1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)	
2. für 24 Stunden	35
3. für 12 Stunden	
4. für 8 Stunden	
5. für 6 Stunden	
6. für 4 Stunden	
7. für 2 Stunden	40
8. für 30 Minuten	
9. sense K3 (10 µl 20 µM K3A)	
10. antisense K3 (10 µl 20 µM K3B)	
<b>[0040] Abb. 14: Inkubation von K2 (2-22-2) in humanem Serum</b>	
1. sense K2 (10 µl 20 µM K2A)	45
2. antisense K2 (10 µl 20 µM K2B)	
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)	
4. für 30 Minuten	50
5. für 2 Stunden	
6. für 4 Stunden	
7. für 6 Stunden	
8. für 8 Stunden	
9. für 12 Stunden	55
10. für 24 Stunden	

#### Schlußfolgerungen

<b>[0041]</b> dsRNAs ohne einzelsträngige Bereiche an den 3'-Enden sind im Serum sowohl von Mensch und Maus wesentlich stabiler als dsRNAs mit einzelsträngigen 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (Abb. 7 bis 11 und 14). Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation von S1 in murinem bzw. humanem Serum ist noch immer eine Bande in der ursprünglichen Größe fast vollständig erhalten. Dagegen nimmt bei dsRNAs mit 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden die Stabilität in humanem als auch im murinen Serum deutlich ab. Bereits nach 4 Stunden Inkubation von S7 (Abb. 9 und 10) oder K3 (Abb. 11) ist keine Bande in der Originalgröße mehr detektierbar. Die Länge des basengepaarten Bereichs hat dabei keinen Einfluß auf die Stabilität, wie ein Vergleich der Serumstabilität von K2 (2-22-, Abb. 14) mit S7 bzw. K3 zeigt. Um die Stabilität von dsRNA im Serum zu erhöhen, ist es ausreichend, wenn die dsRNA ein glattes Ende besitzt. Im Maus-Serum ist nach 4	60
	65



# DE 101 60 151 A 1

Stunden Inkubation **Abb. 12**, Bahn 5) die Bande in der Originalgröße kaum abgebaut im Vergleich zu S7 (nach 4 Stunden vollständiger Abbau, **Abb. 9**, Bahn 3).

- [0042] Kombination von Serumstabilität und Effizienz bei der Inhibition von Zielgenen: als optimaler Kompromiß hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit von dsRNA kann die Verwendung von dsRNA mit einem glattem Ende und einem einzelsträngigem Bereich von 2 Nukleotiden angesehen werden, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende der zum Zielgen komplementären Sequenz auf dem als antisense bezeichneten Strang (S1) befinden muß.

## Sequenzen

10	<b>S1</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3` (B) 3`- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	0-22-0
15	<b>S7</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5`	2-19-2
20	<b>K1</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3` (B) 3`- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	0-22-0
25	<b>K3</b>	(A) 5`- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3` (B) 3`- UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5`	2-19-2
30	<b>K2</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3` (B) 3`- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	2-22-2
35	<b>S1A/ S4B</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3` (B) 3`- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	0-22-2
40	<b>PKC 1/2</b>	(A) 5`- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3` (B) 3`- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5`	2-22-0
45	<b>S7/S12</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5`	0-21-0
50	<b>S7/S11</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3` (B) 3`- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5`	0-21-2
55	<b>S4</b>	(A) 5`- CCACAUGAAGCAGCACGACUUCU -3` (B) 3`- CTGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5`	2-22-2
60	<b>K1A/ K2B</b>	(A) 5`- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3` (B) 3`- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5`	0-22-2

65

<b>K1B/ K2A</b>	(A) 5´ - ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3´ (B) 3´ - UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5´	<b>2-22-0</b>	5
<b>S1B/ S4A</b>	(A) 5´ - CCACAUGAAGCAGCAGACUUCUU -3´ (B) 3´ - GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5´	<b>2-22-0</b>	10

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang (S1) der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist. 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist. 20
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist. 25
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intrataumoral, intravenös oder intraperitoneal verabreicht wird. 30
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird. 35
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreicht wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird. 40
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird. 45
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. 50
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht wird.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird. 55
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloge gebildet wird.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. 60
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält. 65
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine mensch-

liche Zelle ist.

26. Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, enthaltend mindestens ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA), wobei ein Strang (S1) der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist.
27. Medikament nach Anspruch 26, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist.
28. Medikament nach Anspruch 26 oder 27, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
29. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
30. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 29, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
31. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 30, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.
32. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 31, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intrataumoral, intravenös oder intraperitoneal verabreicht wird.
33. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 32, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen ist.
34. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 33, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
35. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 34, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreichbar ist.
36. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 35, wobei es derart portioniert ist, dass die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreichbar ist.
37. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 36, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
38. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 37, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
39. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 38, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
40. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 39, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
41. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 40, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
42. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 41, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
43. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 42, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht ist.
44. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 43, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.
45. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 44, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet ist.
46. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 45, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
47. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 46, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
48. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 47, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
49. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 48, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
50. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 49, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
51. Verwendung eines doppelsträngigen Oligoribonukleotids (dsRNA), bei dem ein Strang (S1) der dsRNA einen zu einem Zielgen komplementären Bereich aufweist, wobei die dsRNA am 5'-Ende des einen Strangs (S1) glatt ausgebildet ist und am 3'-Ende des einen Strangs (S1) einen Überhang von 1 bis 4 Nukleotiden aufweist, zur Hemmung der Expression des Zielgens in einer Zelle.
52. Verwendung nach Anspruch 51, wobei der Überhang aus 1 oder 2 Nukleotiden gebildet ist.
53. Verwendung nach Anspruch 51 oder 52, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
54. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 53, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 19 bis 24, vorzugsweise 19 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
55. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 54, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
56. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 55, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.
57. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 56, wobei die dsRNA oral, inhalativ, intrataumoral, intravenös oder intraperitoneal verabreicht wird.

58. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 57, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
59. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 58, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird. 5
60. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 59, wobei die dsRNA mittels Injektion oder Infusion verabreicht wird.
61. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 60, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.
62. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 61, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird. 10
63. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 62, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
64. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 63, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird. 15
65. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 64, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
66. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 65, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
67. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 66, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
68. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 67, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfungen erhöht wird. 20
69. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 68, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird. 25
70. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.
71. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 70, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. 30
72. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 71, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
73. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 72, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
74. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 73, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist. 35
75. Verwendung nach einem der Ansprüche 51 bis 74, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- Zur Erläuterung der vorgenannten Merkmale wird insbesondere auch auf die WO 00/44895 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hiermit vollinhaltlich einbezogen wird. 40

---

Hierzu 14 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

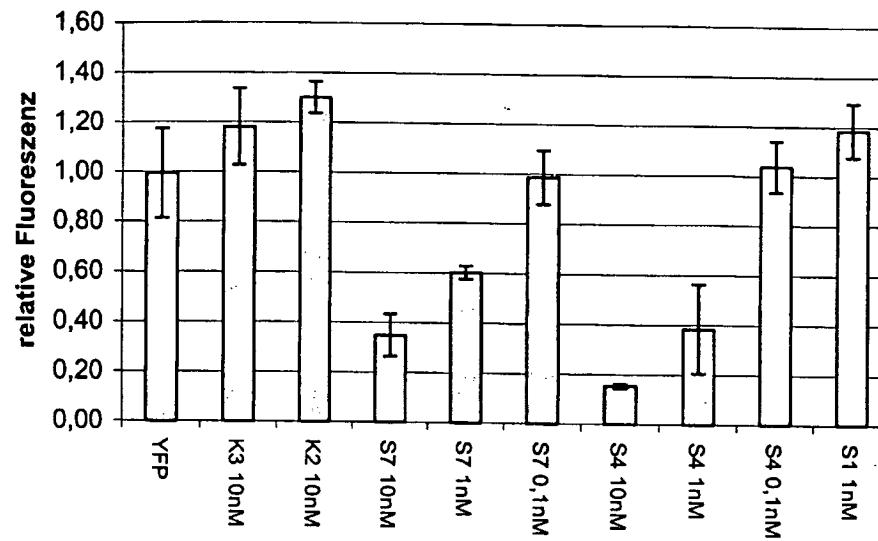
Abb. 1

Abb. 2

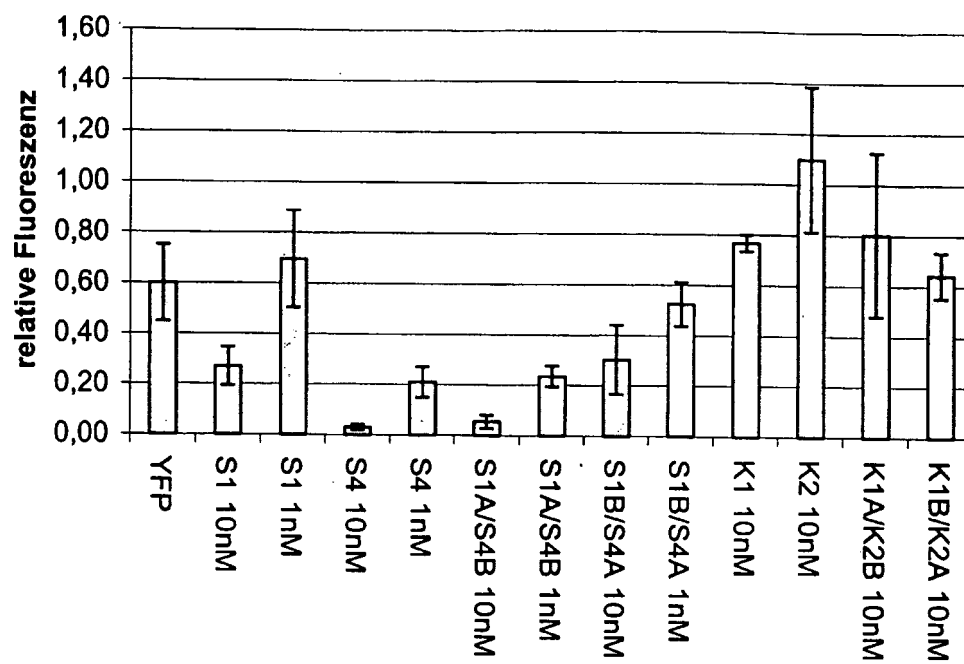


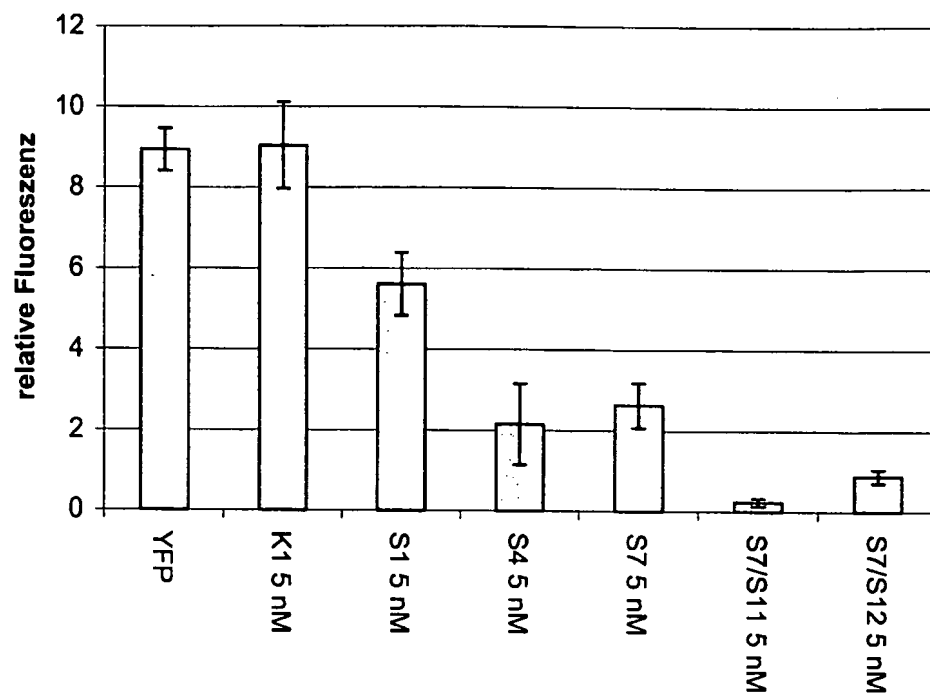
Abb. 3



Abb. 4

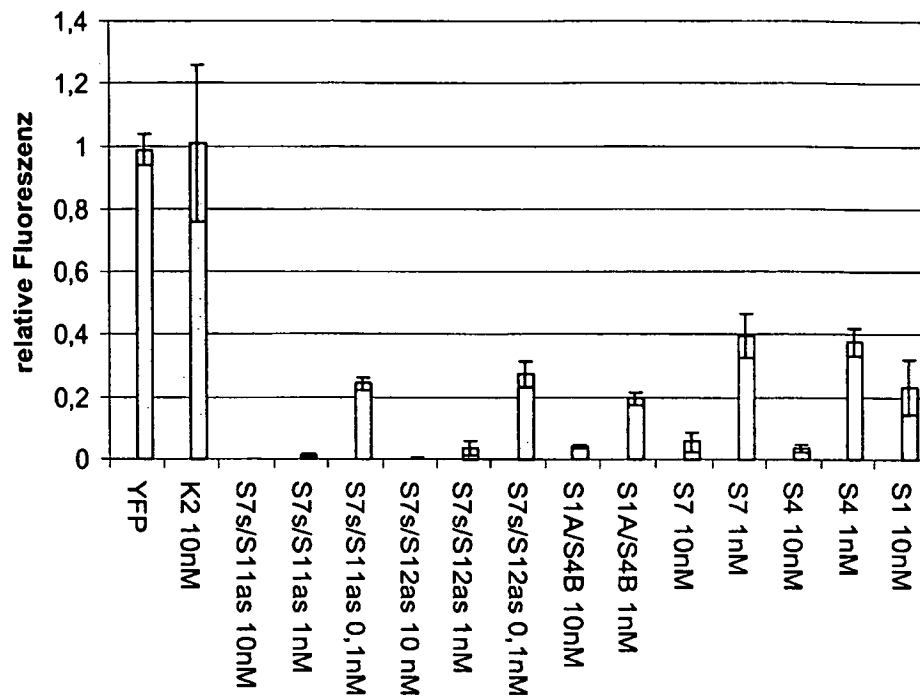


Abb. 5

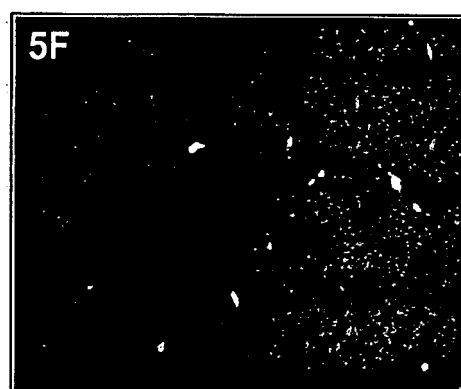
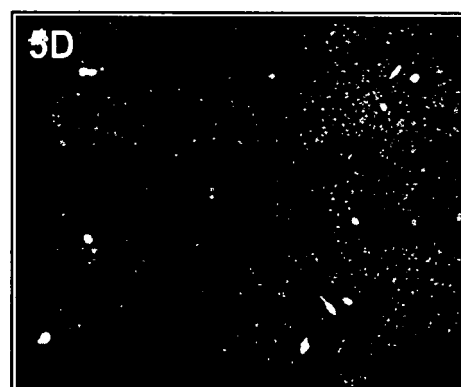
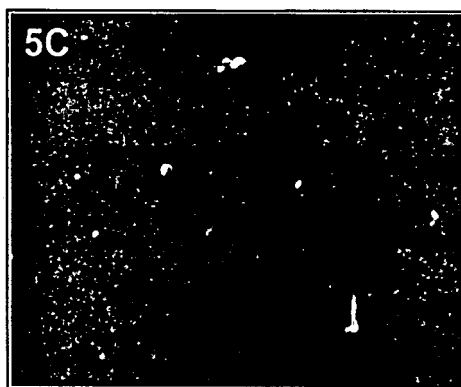
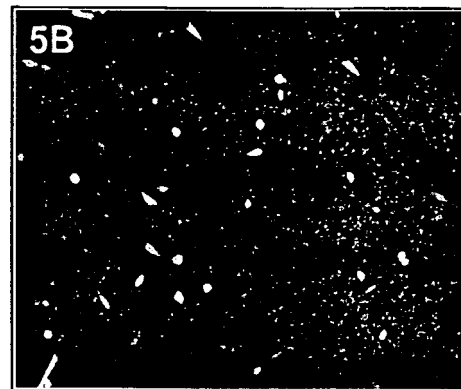
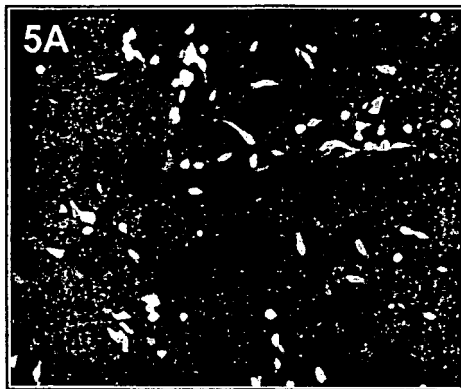
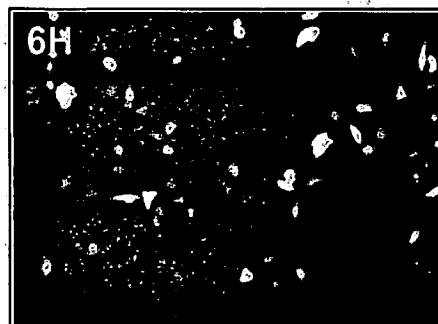
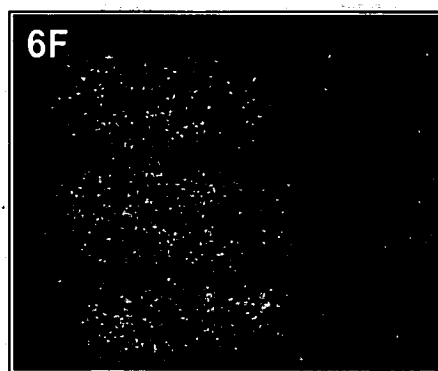
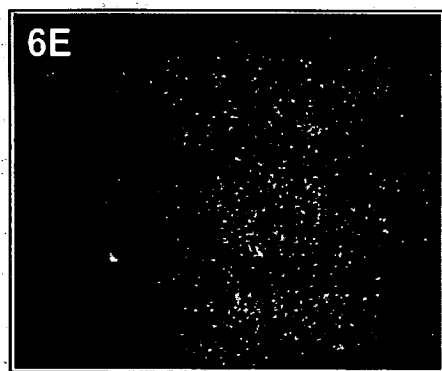
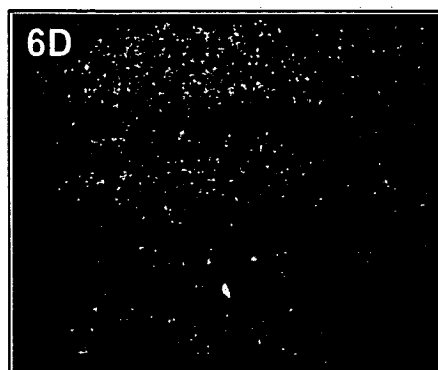
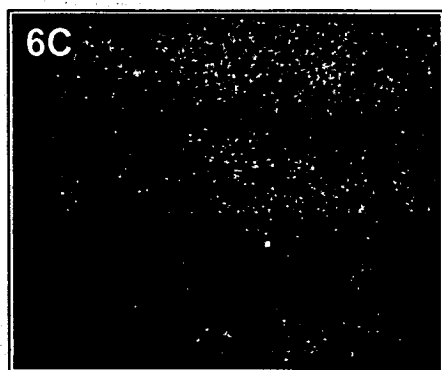
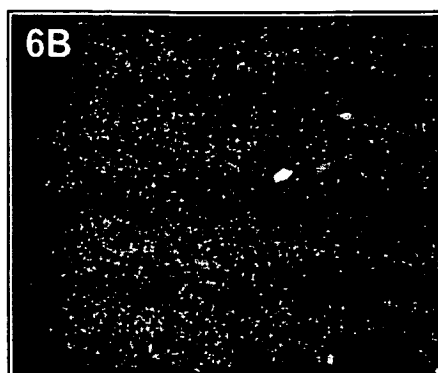
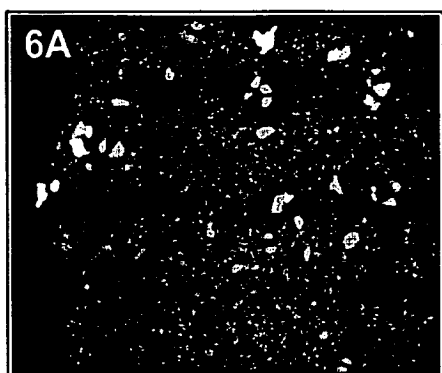
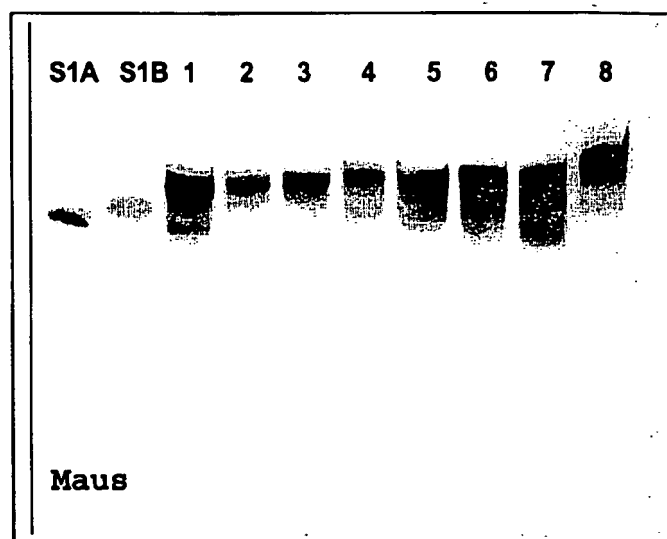


Abb. 6

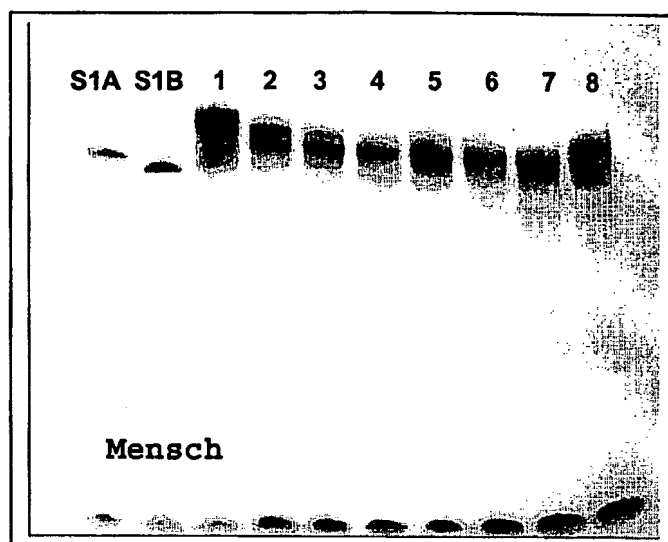


Do

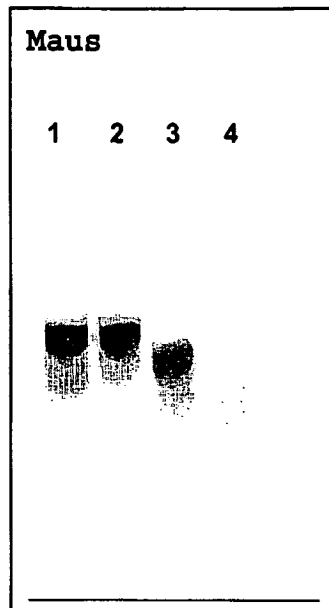
Abb. 7



**Abb. 8**



**Abb. 9**



**Abb. 10**

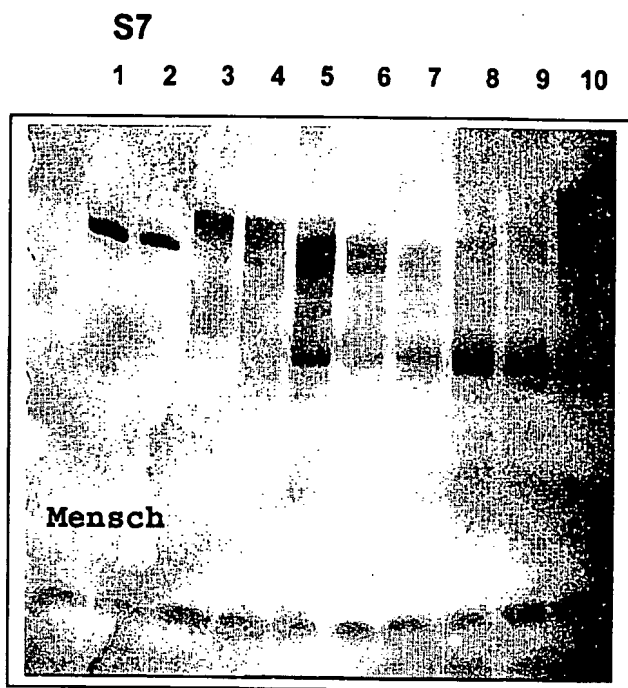
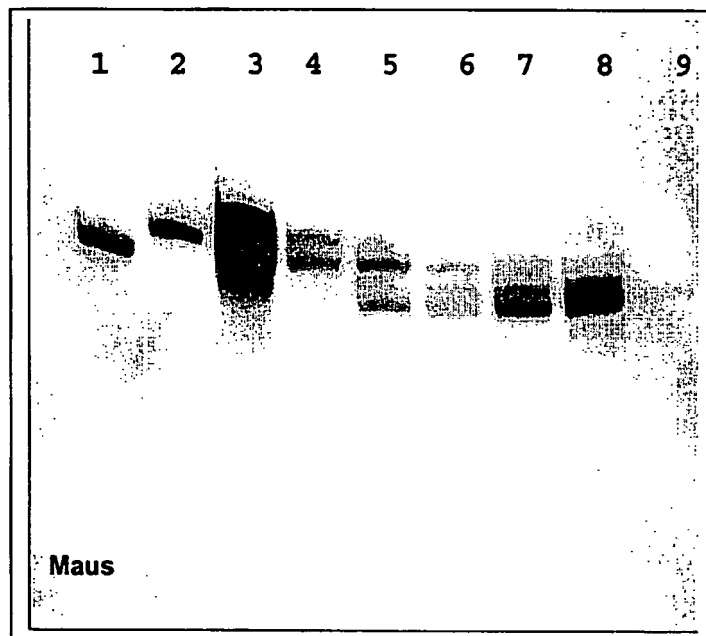
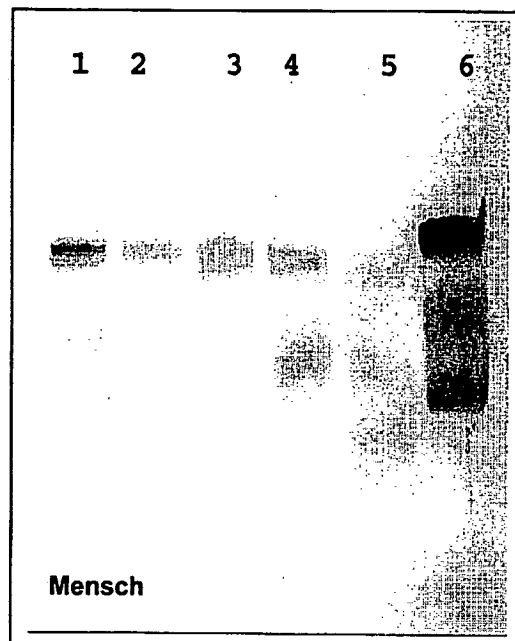


Abb. 11





**Abb. 12**



**Abb. 13**

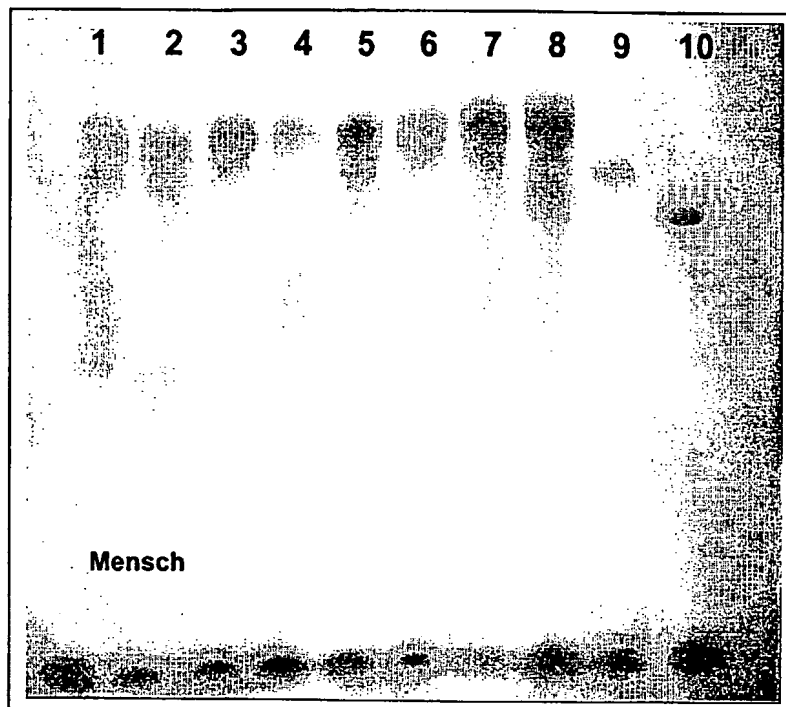


Abb.14

